

2-Substituted 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-one compound processs for their preparation and medicaments containing them

Publication number: DE3145473

Publication date: 1982-08-26

Inventor: PERREGAARD JANS KRISTIAN DIPL (DK)

Applicant: KEFALAS AS (DK)

Classification:

- International: **C07D498/04; C07D498/00**; (IPC1-7): C07D498/04;
A61K31/42; A61K31/44

- european: C07D498/04

Application number: DE19813145473 19811116

Priority number(s): GB19800038140 19801127

Also published as



JP5711851
FR249469

Best Available Copy

Report a data error

Abstract not available for DE3145473

Abstract of corresponding document: **FR2494691**

2-Substituted 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-one compounds having the general formula I, in which R represents a branched or unbranched alkyl group having 1 to 17 carbon atoms inclusive, a phenyl group optionally substituted by one or two lower alkyl groups, lower alkyloxy groups or halogen atoms, a phenylalkyl group, a lower alkyloxy group or a group -NHR<1> in which R<1> represents hydrogen, a lower alkyl, phenyl or cyclohexyl group, and pharmaceutically acceptable acid addition salts of these compounds have an activity connected to the activity of gamma-aminobutyric acid (GABA) and are indicated for use in the treatment of diseases which are connected to the faulty function of the GABA system, such as epilepsy, Parkinsonism, schizophrenia, Huntington's chorea (hereditary progressive chorea), diseases in which a faulty function of the pituitary hormone plays a role and cerebral arteriosclerosis. The compounds additionally exhibit potent analgesic and myotonic action. They are prepared by acylating compounds of the general formula in which R<2> represents an amino-protecting group which is easily removable after acylation without affecting the acylated hydroxyl group. The invention also relates to medicaments which contain a compound of the formula I as active substance.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑳ Aktonzeichen:
㉑ Anmeldetag:
㉒ Offenlegungstag:

P 31 45 473.9
16. 11. 81
26. 8. 82

Behördenzeichen

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③④
27.11.80 GB 8038140

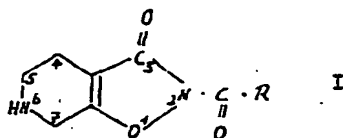
⑦① Anmelder:
Kefalas A/S, Koebenhavn-Valby, DK

⑦④ Vertreter:
Berendt, T., Dipl.-Chem. Dr.; Leyh, H., Dipl.-Ing. Dr.-Ing.,
Pat.-Anw., 8000 München

⑦② Erfinder:
Perregaard, Jans Kristian, Dipl.-Ing., Oelstykke, DK

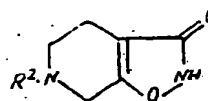
⑤② 2-Substituierte 4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo [5,4-c] pyridin-3-on-Verbindungen, Verfahren zu ihrer Herstellung und diese enthaltende Arzneimittel

2-Substituierte 4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-on-Verbindungen mit der allgemeinen Formel



in der R eine verzweigte oder unverzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 17 Kohlenstoffatomen einschließlich, eine gegebenenfalls mit ein oder zwei niederen Alkylgruppen, niederen Alkoxygruppen oder Halogenatomen substituierte Phenylgruppe, eine Phenylalkylgruppe, eine niedere Alkoxygruppe oder eine Gruppe $-NHR^1$. In der R^1 Wasserstoff, eine niedere Alkyl-, Phenyl- oder Cyclohexylgruppe ist, darstellend, sowie pharmazeutisch unbedenkliche Säuroadditionssalze dieser Verbindungen haben eine mit der γ -Aminobuttersäure (GABA) in Verbindung stehende Aktivität und besitzen eine Indikation zur Verwendung bei der Behandlung von Krankheiten, die mit der fehlerhaften Funktion des GABA-Systems zusammenhängen, wie Epilepsie, Parkinsonismus, Schizophrenie, Huntington's Chorea (Chorea chronica progressiva hereditaria), Krankheiten, bei denen eine fehlerhafte Funktion der Hypophysenhormone eine Rolle spielt und zerebrale Arteriosklerose. Außerdem zeigen die Verbindungen starke

analgetische und myotonische Wirkung. Sie werden hergestellt durch Acylieren von Verbindungen der allgemeinen Formel



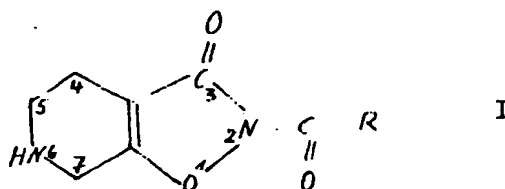
in der R^2 eine die Aminogruppe schützende Gruppe darstellt, die nach der Acylierung leicht abspaltbar ist, ohne die acylierte Hydroxygruppe zu beeinträchtigen. Die Erfindung betrifft ferner Arzneimittel, die eine Verbindung der Formel I als Wirkstoff enthalten. (31 45 473)

DE 31 45 473 A 1

DE 31 45 473 A 1

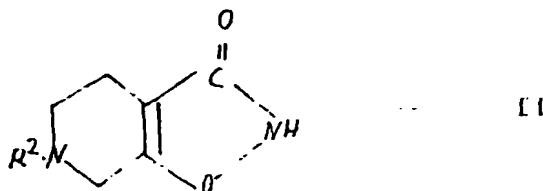
Patentansprüche

1. 2-Substituierte 4,4',6,7-Tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-on-Verbindungen der allgemeinen Formel



in der R eine verzweigte oder unverzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 17 Kohlenstoffatomen einschließlich, eine Phenylgruppe, die gegebenenfalls mit 1 oder 2 Gruppen, ausgewählt aus niederen Alkylgruppen, niederen Alkoxygruppen und Halogenatomen substituiert ist, eine Phenylalkylgruppe, eine niedere Alkyloxygruppe oder eine Gruppe $-NHR^1$, in der R^1 Wasserstoff, eine niedere Alkyl-, Phenyl- oder Cyclohexylgruppe bedeutet, und deren pharmazeutisch unbedenkliche Säureadditionssalze.

2. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1, sowie deren pharmazeutisch unbedenkliche Salze, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung der allgemeinen Formel



in der R^2 eine Schutzgruppe für die Aminogruppe ist, die leicht entfernbar ist, mit einem reaktiven Derivat einer Säure der Formel $R \cdot COOH$, in der R die genannte Bedeutung hat, umsetzt und anschließend die Schutzgruppe R^2 abspaltet und die Verbindung der Formel I als freie Base oder in Form eines pharmazeutisch unbedenklichen Säureadditionssalzes isoliert.

-2-

3. Arzneimittel, enthaltend als Wirkstoff einer Verbindung der allgemeinen Formel I nach Anspruch 1 oder ein pharmazeutisch unbedenkliches Salz davon, zusammen mit einem üblichen pharmazeutischen Träger oder Excipienten.

4. Arzneimittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich eine kleinere Menge eines Tranquillizers oder Neuroleptikums enthält.

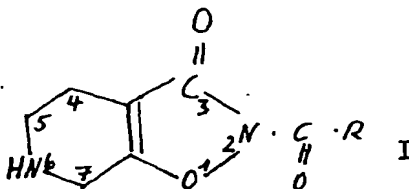
- 3 -

Kefalas A/S
Kopenhagen-Valby,
Dänemark

2-Substituierte 4,5,6,7-Tetrahydroisoxazolo [5,4-c]pyri-
din-3-on-Verbindungen, Verfahren zu ihrer Herstellung
und diese enthaltende Arzneimittel

Beschreibung

Die Erfindung betrifft bisher nicht bekannte Verbindungen der allgemeinen Formel



in der R eine verzweigte oder unverzweigte Alkylgruppe mit 1 bis 17 Kohlenstoffatomen einschließlich, eine Phenylgruppe, die gegebenenfalls mit 1 oder 2 Gruppen, ausgewählt aus niederen Alkylgruppen, niederen Alkyloxygruppen und Halogenatomen substituiert ist, eine Phenylalkylgruppe, eine niedere Alkyloxygruppe oder eine Gruppe -NHR^1 , in der R^1 Wasserstoff, eine niedere Alkyl-, Phenyl- oder Cyclohexylgruppe ist, darstellt, sowie deren pharmazeutisch unbedenkliche Säureadditionssalze, von denen gezeigt werden konnte, daß sie eine mit γ -Aminobuttersäure (GABA) in Verbindung stehende Wirkung haben und zur Verwendung zur Behandlung von Krankheiten indiziert sind, die mit einer fehlerhaften Funktion des GABA-Systems in Verbindung stehen, wie Epilepsie, Parkinsonismus, Schizophrenie, Huntington's Chorea (Chorea chronica progressiva hereditaria), Krankheiten, die auf der fehlerhaften Funktion von Hypophysenhormonen beruhen und zerebraler Arteriosklerose.

Darüberhinaus zeigen die Verbindungen starke analgetische und myotonische Wirkungen.

Die Verbindung 4,5,6,7-Tetra-hydro-isoxazolo [5,4-c]pyridin-3-ol (im folgenden kurz THIP bezeichnet) hat, wie gezeigt wurde, eine Aktivität, die in Beziehung zu GABA steht, wie dies z.B. in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 78 100 191.2 beschrieben ist. Sie hat jedoch eine relativ kurze Wirkungs-dauer und auch einige Nebenwirkungen.

Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise gefunden, daß Verbindungen der Formel I und wie ihre pharmazeutisch unbedenklichen Säureadditionssalze eine mit GABA in Verbindung stehende Aktivität gleicher Größenordnung besitzen, wie dies bei der Verbindung THIP der Fall ist und einige der neuen Verbindungen gemäß der Erfindung zeigen sogar eine verlängerte Wirkung, verglichen mit THIP. Darüberhinaus zeigen diese Verbindungen ausgeprägte analgetische und myotonische Wirkungen.

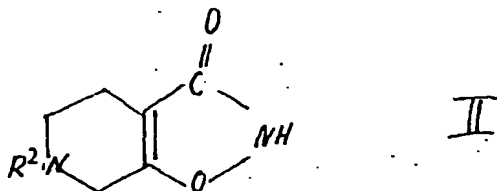
Die Erfindung betrifft weiterhin neue Arzneimittel, die als Wirkstoff eine Verbindung der Formel I oder ein pharmazeutisch unbedenkliches Säureadditionssalz davon enthalten.

Die Erfindung umfaßt auch ein Verfahren zur Herstellung der Verbindungen der Formel I und Verfahren zur Behandlung von Krankheiten, die mit der fehlerhaften Funktion des GABA-Systems in Verbindung stehen, ein Verfahren zur Erleichterung von Schmerzen wechselnder Etiologie und ein Verfahren zur Behandlung von mytonischen Zuständen (z.B. zur Induzierung der Muskeler schlaffung oder zur Behandlung von Muskelkrämpfen oder muskulärer Krampferscheinungen).

Die Ausdrücke "niedere Alkylgruppen" und "niedere Alkoxygruppen" umfassen solche Gruppen, die 1 bis 6 Kohlenstoffatome einschließ lich haben.

Beispiele pharmazeutisch unbedenklicher Salze von Verbindungen der Formel I sind Salze mit anorganischen Säuren, z.B. Hydrochloride, Hydrobromide, Nitrate, Sulfate, Phosphate und dergleichen oder mit organischen Säuren, wie Acetate, Propionate, Glycolate, Malonate, Maleate, Succinate, Fumarate, Tartrate, Citrate, Oxalate, Benzoate, Pamoate, Methansulfonate, Äthansulfonate, Benzolsulfonate, Toluolsulfonate und dergleichen, wobei diese Salze durch an sich bekannte Verfahren hergestellt werden können, z.B. durch Zugabe der fraglichen Säure zur Base, vorzugsweise in einem Lösungsmittel.

Gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren wird eine Verbindung der allgemeinen Formel



in der R^2 eine Schutzgruppe für die Aminogruppe ist, die leicht entfernbar ist, mit einem reaktiven Derivat einer Säure der Formel $R\cdot\text{COOH}$, wobei R die genannte Bedeutung hat, acyliert, wonach die Schutzgruppe R^2 abgespalten wird und die Verbindung der Formel I als freie Base oder als pharmazeutisch unbedenkliches Säureadditionssalz isoliert wird.

Wenn R eine $-\text{NHR}^1$ -Gruppe ist, hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, als reaktives Derivat ein Isocyanat der Formel $R^1-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ zu verwenden.

Als Schutzgruppe R^2 werden vorzugsweise Gruppen verwendet, die anschließend leicht abgespalten werden können, wie Alkyloxycarbonylgruppen. Vorzugsweise wurde eine Substitution mit tertiär-Butyloxycarbonylgruppen angewendet gemäß dem Verfahren von Tarbell et al, in Proc.Nat.Acad.Sci., Bd. 69(3), Seite 730, 1972.

Die N-Acylierung gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren wird in üblicher Weise in einem organischen Lösungsmittel bei Rückflußtemperaturen durchgeführt.

Einige der Ausgangsstoffe der Formel II werden zweckmäßig durch Umsetzen von 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]pyridin-3-ol (im folgenden als THIP abgekürzt) mit einem Di-alkyldicarbonat, vorzugsweise ditertiär-Butyldicarbonat hergestellt. Nach der Acylierung gemäß der Erfindung wird die Schutzgruppe R^2 gegebenenfalls unter milden Be-

- 7 -

dingungen, wie kontrollierter Hydrolyse abgespalten. Wenn R^2 eine tertiär-Butyloxy^{carbonyl}gruppe ist, kann sie zweckmäßig durch Reaktion mit wasserfreier Trifluoressigsäure bei etwa 0°C entfernt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die folgenden Arbeitsbeispiele erläutert, die jedoch nicht als Beschränkung dienen sollen.

Beispiel 1

3-Hydroxy-6-(t-butyloxycarbonyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]pyridin(t-BOC THIP).

Es wurden 11,1 g THIP x HBr in 50 cm^3 Dioxan und 25 cm^3 Wasser suspendiert. Durch Zugabe von 4,0 g NaOH in 25 cm^3 Wasser unter Eiskühlung wurde eine klare Lösung erhalten. Es wurden danach 11,0 g Di-t-butyldicarbonat zugefügt und die Temperatur auf 25°C steigen gelassen. Das Gemisch wurde weitere 1,5 Stunden heftig gerührt. Danach wurden 300 cm^3 Äthylacetat und 100 cm^3 Wasser zugesetzt und der pH-Wert der wäßrigen Lösung auf $\sim 3,0$ mit einer KHSO_4 -Lösung eingestellt. Die Äthylacetatphase wurde abgetrennt und mit $2 \times 25\text{ cm}^3$ Wasser gewaschen, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel abgedampft, wobei 11,8 g (98 %) Produkt zurückblieb. F. $134-136^\circ\text{C}$, IR (KBr): ν_{OH} 2400-3200 (breite, komplexe Banden), $\nu_{\text{C=O}}$ 1690 cm^{-1} .

Beispiel 2

2-Benzoyl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]pyridin-2-on und dessen Oxalat.

Es wurden 2,4 g t-Butyloxycarbonyl - THIP mit 2,5 g Benzoesäureanhydrid in 40 cm^3 CHCl_3 13 Stunden unter Rückflußbedingungen erwärmt. Die organische Lösung wurde mit eis-

- 8 -

gekühlter 0,1 m-Kaliumcarbonatlösung (2 x 25 cm³) gewaschen, über wasserfreiem Magnesiumsulfat ^{getrocknet} und das Chloroform abgedampft. Das zurückbleibende Öl wurde in 20 cm³ eines Gemisches aus Äther und n-Hexan im Verhältnis 1:1 gelöst. Nachdem eine Weile gerührt und gekühlt wurde, fiel 2-Benzoyl-6-(t-butyloxycarbonyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]pyridin-3-on aus. Ausbeute: 1,3 g (38 %). F. 126-128°C.

Dieses Produkt wurde zu 10 cm³ eisgekühlter wasserfreier Trifluoressigsäure zugefügt. Das Gemisch wurde gerührt, bis die Entwicklung von Kohlendioxid aufgehört hatte. Überflüssige Trifluoressigsäure wurde abgedampft und das erhaltene Öl wurde in einigen Kubikzentimetern trockenem Aceton gelöst. Es wurden 2 g wasserfreie Oxalsäure in 10 cm³ trockenem Aceton zugefügt. Unter Rühren und Kühlen fiel das Oxalat von 2-Benzoyl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]-3-on aus. Ausbeute: 89 %. F. 210-213°C (Zersetzung). (Gefunden: C 53,22; H 4,45; N 8,08; für C₁₅H₁₄N₂O₇ berechnet: C 53,89; H 4,23; N 8,38 %).

Beispiel 3

2-Acetyl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]pyridin-3-on und dessen Oxalat.

Es wurden 7,2 g t-Butyloxycarbonyl-THIP unter Rückflußbedingungen mit 5,0 g Essigsäureanhydrid in 50 cm³ Chloroform 2 Stunden erhitzt. Es wurde 2-Acetyl-6-(t-butyloxycarbonyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]pyridin-3-on als Öl in einer Ausbeute von 6,4 g (76 %) durch Säulenchromatographie (über Silicagel 60 "Merck") nach Elution mit einem Gemisch aus Äther und CH₂Cl₂ im Verhältnis 1:3 isoliert. Die t-Butyloxycarbonylgruppe wurde wie gemäß Beispiel 2 abgespalten, wobei 73 % des Oxalats erhalten wurden. F. 177-178°C (Zersetzung) (Gefunden: C 44,32; H 4,70; N 10,58; für C₁₀H₁₂N₂O₇ berechnet: C 44,12; H 4,45; N 10,29 %).

Beispiel 4

2-Isobutyryl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-on und dessen Oxalat.

Das Zwischenprodukt, 2-Isobutyryl-6-(t-butyloxycarbonyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-on wurde gemäß Beispiel 3 hergestellt und isoliert in einer Ausbeute von 82 %. F. 118-119°C. Die t-Butyloxycarbonylgruppe wurde gemäß Beispiel 2 abgespalten und es wurden 94 % Ausbeute des Oxalats erhalten. F. 174-176°C (Zersetzung) (Gefunden: C 47,72; H 5,50; N 9,45; für $C_{12}H_{16}N_2O_7$ berechnet C 47,99; H 5,38; N 9,33 %).

Beispiel 5

2-Carbamoyl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-on und dessen Oxalat.

Zu einer Suspension von 3,2 g Kaliumcyanat in 50 cm³ CH₂Cl₂ wurde eine Lösung von 4,0 g Trifluoressigsäure in 50 cm³ CH₂Cl₂ bei 0°C zugefügt. Es wurden langsam unter Kühlen 4,8 g t-Butyloxycarbonyl-THIP, gelöst in 100 cm³ CH₂Cl₂ zugefügt. Das Gemisch wurde weiter bei Raumtemperatur 0,5 Stunden gerührt. Das gesamte Reaktionsgemisch wurde der Säulenchromatographie unterworfen, ohne daß CH₂Cl₂ verdampft wurde. Es wurden mit 10 % Methanol in Äther 4,6 g (81 %) 2-Carbamoyl-6-(t-butyloxycarbonyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-on eluiert. Ausbeute: 4,6 g (81 %). F. 129-131°C. Die t-Butyloxycarbonylgruppe wird gemäß Beispiel 2 abgespalten, Ausbeute: 87 % des Oxalats. F. 209-210°C (Zersetzung) (Gefunden: C 39,48; H 4,24; N 15,31; für $C_9H_{11}N_3O_7$ berechnet: C 39,56; H 4,07; N 15,38 %).

Beispiel 6

2-(N-Methylcarbamoyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-on und dessen Oxalat.

- 10 -

Es wurden 4,8 g t-Butyloxycarbonyl-THIP mit 3,0 g Methylisocyanat in 50 cm³ CH₂Cl₂ 1,5 Stunden unter Rückflußbedingungen erhitzt. Das Lösungsmittel wurde abgedampft. Die zurückbleibende feste Substanz wurde mit kaltem Isopropyläther gerührt, wobei 5,4 g (91 %) 2-(N-Methylcarbamoyl)-6-(t-butyloxycarbonyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]-pyridin-3-on von F. 134-135°C erhalten wurde. Die t-Butyloxycarbonylgruppe wurde gemäß Beispiel 2 abgespalten, wonach 90 % des Oxalats erhalten wurden. F. 168-169°C (Zersetzung) (Gefunden: C 41,60; H 4,74; N 14,43; für C₁₀H₁₃N₃O₇ berechnet: C 41,81; H 4,57; N 14,63 %).

Beispiel 7

2-(N-Cyclohexylcarbamoyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]-pyridin-3-on und dessen Oxalat.

Es wurden 3,6 g t-Butyloxycarbonyl-THIP mit 1,9 g Cyclohexylisocyanat in 50 cm³ CH₂Cl₂ 2 Stunden unter Rückflußbedingungen erhitzt. Der größte Teil des CH₂Cl₂ wurde verdampft und durch Zugabe von n-Hexan fiel 2-N-Cyclohexylcarbamoyl)-6-(t-butyloxycarbonyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]pyridin-3-on aus. Ausbeute: 4,8 g (88 %). F. 92-94°C. Die t-Butyloxycarbonylgruppe wurde gemäß Beispiel 2 abgespalten, wonach 87 % des Oxalats erhalten wurden. F. 204-205°C (Zersetzung) (Gefunden: C 50,53; H 6,17; N 11,45; für C₁₅H₂₁N₃O₇ berechnet: C 50,69; H 5,97; N 11,83%).

Beispiel 8

2-(N-Phenylcarbamoyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo [5,4-c]pyridin-3-on und dessen Oxalat.

Es wurden 4,8 g t-Butyloxycarbonyl-THIP, 2,1 Triethylamin und 2,5 g Phenylisocyanat in 50 cm³ trockenem Tetrahydrofuran 1,5 Stunden unter Rückflußbedingungen erhitzt. Das flüchtige Material wurde abgedampft und das zurückbleibende Öl wurde in 100 cm³ Äther gelöst. Aus der Lösung fiel 2-(N-Phenyl-

carbamoyl(-6-(t-butyloxycarbonyl)-4,5,6,7-tetrahydroisoxa-
zolo[5,4-c]pyridin-3-on aus. Ausbeute : 4,9 g (68 %).
F. 152-154°C.

Die t-Butyloxycarbonylgruppe wurde gemäß Beispiel 2 abge-
spalten und ergab 90 % Ausbeute des Oxalats. F. 214-218°C.
(Zersetzung) (Gefunden: C 52,02; H 4,40; N 12,01; für
C₁₅H₁₅N₃O₇ berechnet: C 51,57; H 4,34; N 12,03 %).

Die Verbindungen von Formel I wurden nach den genormten
zuverlässigen Testmethoden geprüft, die im folgenden be-
schrieben werden.

Isoniazid-Antagonismus

Männliche Mäuse, 20 - 25 g
Isoniazid 300 mg/kg subkutan
Macrolon-Käfige Typ II

Dosierung und Verfahrensweise

Die Versuchsverbindung wird intraperitoneal in der Dosierung
0, 1/2, 1/8 und 1/32 der intravenös ermittelten LD₅₀ injiziert.

Im Fall von unlöslichen Substanzen ⁻¹²⁻ werden die Dosierungen 0, 1/4, 1/16 und 1/64 der intraperitoneal bestimmten Dosierungen LD₅₀ verwendet.

Es wurden für jede Dosierung 5 Mäuse verwendet.

Unmittelbar nach der Verabreichung der Versuchssubstanzen wurden 300 mg/kg Isoniacid subkutan injiziert. Diese Dosis Isoniacid induziert unterbrochene tonische clonische Krämpfe innerhalb von 60 Minuten.

Die Berechnungen wurden durchgeführt im direkten Verfahren "on line" am Terminal einer Datenverarbeitungsanlage. Die Ergebnisse wurden als prozentualer Zeitanstieg während des Auftretens der Krämpfe wiedergegeben und zusätzlich wurde die letzte Dosis berechnet, die einen wesentlichen Effekt zeigt (MED - minimale wirksame Dosis), berechnet mittels des Van der Waerden-Tests.

Die EP₅₀ wird als diejenige Dosis in mg/kg bestimmt, die diese Zeit um 50 % ansteigen läßt.

Gitterschockversuch bei Mäusen

Männliche Mäuse , 20 - 23 g.

Das Mäusergitter besteht aus einem Käfig aus unzerbrechlichem Kunststoffglas mit einem Boden aus Drahtgitter und einem Deckel aus dem Kunststoffglas, auf welchem ein Mikrophon angebracht ist, das für die Frequenz von Mäuseschreien empfindlich ist. Ein Stimulator mit einem Potentiometer mit Motorantrieb bringt eine Reihenfolge von Quadratwellenimpulsen mit kontinuierlich ansteigender Stromstärke (in Milliampere) auf das Gitter auf. Die Häufigkeit der Impulse beträgt 20 Zyklen/sek. für die Dauer von 5 Millisekunden. Die Stromstärke in Milliampere wird auf einen digitalen Amperemeter wiedergegeben, das mit dem Stimulator verbunden ist. Die Aktivierung des Mikrophons durch Mäuseschreie schneidet die Stromstärke ab und die letzte Stromstärke erscheint auf dem Milliampere meter.

Dosierung und Verfahrensweise

Die Testsubstanz wird intraperitoneal in den Dosierungen 1/2, 1/4 und 1/8 der intravenös bestimmten LD₅₀ verabreicht. Bei unlöslichen Substanzen werden die Dosierungen 1/4, 1/8 und 1/16 der intraperitoneal bestimmten LD₅₀ verwendet. 5 Mäuse werden für jede Dosierung gebraucht. Jede Maus dient als Ihre eigene Kontrolle.

Vor der Verabreichung der Testsubstanz werden die Tiere (jeweils eines gleichzeitig) auf das Gitter gesetzt und die Schmerzschwelle wird durch Ansteigen der Intensität der Stromstärke bestimmt, bis die Maus schreit. Die Schmerzschwelle kann auf dem Milliampereometer abgelesen werden.

15 Minuten und 30 Minuten nach der Verabreichung der Testsubstanz werden die Mäuse erneut getestet und die Schmerzschwelle gemessen. Außerdem kann die Testsubstanz nach der oralen Verabreichung in den Dosierungen 1, 1/2 und 1/4 der intravenös bestimmten LD₅₀ geprüft werden und die Schmerzschwelle wird vor und 30 Minuten nach Verabreichung bestimmt. Unlösliche Testsubstanzen werden oral in den Dosierungen 1/2, 1/4 und 1/8 der intraperitoneal bestimmten LD₅₀ getestet.

Die analgetische Wirkung ist vorhanden, wenn die Schmerzschwelle über den Wert vor der Dosierung (Kontrollwert) erhöht ist. Die Resultate werden als prozentualer Anstieg der Schmerzschwelle wiedergegeben, berechnet auf der Basis des Kontrollwertes. Die Registrierung kann auch direkt auf der Datenverarbeitungsanlage ("on line") erfolgen. In diesem Fall werden die Lochkarteninstruktion^{en} und die Lochkarten selbst automatisch erzeugt und die Ergebnisse werden als minimale wirksame Dosis (MED) nach dem X-Test von van der Waerden aufgezeichnet.

Bestimmung der Bindung von ³H-GABA an die Gehirnmembrane der Ratten

Ratten im Gewicht von 125 - 200 g

0,32 m-Saccharose (täglich frisch hergestellt)

10 % Triton X-100

0,05 n-Tris-Citrat-Puffer (pH 6,8)

6,05 g Trisma^(R) (Base)

3,502 g Citronensäure. H₂O auf

1 Liter Wasser

³H-GABA = Aminobuttersäure, γ-2,3-³H(N) (etwa).

35 Ci/mmol (New England Nuclear)

(täglich auf 1 μM mit Wasser verdünnt).

Verfahrensweise

A. Preparierung der Membrane

Ratten wurden durch einen Schlag auf den Kopf getötet, ausbluten gelassen und die Gehirne entfernt und in eiskalter Salzlösung gekühlt. Nach dem Spülen und Wiegen wurden zwei Gehirne zusammen homogenisiert in 40 cm³ eiskalter 0,32 m-Saccharoselösung unter Verwendung eines Homogenisiergeräts mit Motorantrieb und einem Pistill aus Teflon (6 Bewegungen auf und nieder, Drehung mit langsamer Geschwindigkeit).

Die Proben wurden 10 Minuten bei 900 g zentrifugiert und anschließend wurden die überstehenden Flüssigkeiten 20 Minuten bei 17 000 g (4°C) zentrifugiert. Zu jedem erhaltenen Pellet wurden 20 cm³ Wasser zugegeben und die Proben wurden 30 Sekunden homogenisiert (Ultra Turrax). Nach Zugabe von weiteren 10 cm³ Wasser wurden die Proben 20 Minuten bei 8 500 g (4°C) zentrifugiert. 2/3 der überstehenden Flüssigkeiten wurden verworfen und der hellbraune obere Teil des Pellets wurde von Hand aufgewirbelt. Diese überstehende Flüssigkeit wurde 30 Minuten bei 37 500 g (4°C) zentrifugiert. Der Pellet wurde 1 Minute in 10 cm³ Wasser homogenisiert (Ultra Turrax). Die Probe wurde in 2 Gläser verteilt und es wurden weitere 25 cm³ Wasser zu jeder Probe

gegeben. Jedes Glas enthielt nun Membranen aus einem Gehirn in 30 cm³ Wasser. Diese Proben werden 30 Minuten bei 37 500 g (4°C) zentrifugiert und die Pellets anschließend in Aceton/CO₂ gefroren, verkorkt und bis zum Gebrauch in gefrorenem Zustand gelagert (wenigstens über Nacht).

B. Vorbehandlung der Membrane

An demjenigen Tag, bei welchem die Messungen durchgeführt werden, wird der Pellet in Aceton/Trockeneis 20 Minuten gefroren und 25 cm³ Wasser werden vor der Homogenisierung (Ultra Turrax) 1 Minute lang zugegeben. Es werden 25 cm³ einer 0,05 n-Tris-Citratpufferlösung und 0,250 cm³ einer 10 %igen Lösung eines oberflächenaktiven Mittels Triton X-100 zugegeben und die Probe wird 30 Minuten bei 37°C bebrütet und danach bei 37 500 g 20 Minuten lang (4°C) zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen und der Pellet wird in 0,05 n-Tris-Citratpufferlösung suspendiert (75 Sekunden im Ultra Turrax) bis zu einer Konzentration von 30 mg ursprünglichem Naßgewicht je cm³. Die Suspension wird 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und danach auf Eis aufbewahrt.

C. Prüfung der Bindekraft

Es werden in jeweils 2 Inkubationsröhrchen auf Eis 780 mm³ Wasser, 200 mm³ des in Wasser gelösten Arzneimittels, 20 mm³ einer Lösung von 1 µMol ³H-GABA (Endkonzentration von ³H-GABA im Röhrchen = 10 nMol) sowie 1000 mm³ der Membransuspension Proben eingefüllt. Nach dem Inkubieren 5 Minuten auf Eis werden die / bei 31 000 g 18 Minuten lang zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen und der Pellet wird sorgfältig mit 3 x 5 cm³ eiskaltem Wasser gespült. Überschüssiges Wasser wird sorgfältig mit weichem Papier abgewischt. Es wird 1 cm³ Soluene 350 zugegeben und die Proben werden 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es werden 10 cm³ Instagel oder Lumagel mit einem Gehalt von 10 cm³ Essigsäure je Liter zugefügt und

die Radioaktivität wird durch einen Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen. Die unspezifische Bindung von ^3H -GABA wird durch Inkubieren der Proben mit 1 mMol GABA bestimmt.

Jede Meßreihe besteht aus 8 Doppelmessungen (1 Vergleichsmessung, 1 Probe mit 1 mMol GABA und 1 bis 2 Reihen Testverbindungen in 3 bis 6 Konzentrationen).

Es wurden die Mittelwerte von Kontrollen und Proben mit 1 mMol GABA berechnet. Die gemessenen cpm-Werte wurden gegen die Arzneimittelsonzentration auf halblogarithmischem Papier aufgetragen und die am besten passende S-förmige Kurve gezeichnet. Die IC_{50} -Werte wurden als diejenigen Konzentrationen bestimmt, bei denen die Bindung 50 % der gesamten Bindung minus der unspezifischen Bindung betrug.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle I aufgeführt, wobei die Versuchssubstanzen durch die Nummer des Beispiels bezeichnet sind, welche die Herstellung der jeweiligen Substanz beschreiben.

Die entsprechenden Versuchswerte für THIP sind als Vergleichswert angegeben.

Tabelle I

Test-substanz	Isoniazid-Antagonismus	Mausgitterschock	^3H -GABA-Bindung IC_{50}
Beispiel 2			$2,0 \cdot 10^{-7}$
" 3	schwacher Effekt	kein Effekt	$> 10^{-4}$
" 5	5,8		$1,9 \cdot 10^{-7}$
" 6	1,3		$2,7 \cdot 10^{-6}$
" 7	2,1		$4,3 \cdot 10^{-7}$
THIP	1,3	+	$1,7 \cdot 10^{-7}$

Die Verbindungen von Formel I und die nicht-toxischen Säureadditionssalze dieser Verbindungen können Tieren, wie Hunden, Katzen, Pferde, Schafe oder dergleichen einschließlich Menschen sowohl oral wie parenteral verabreicht werden und können

-19-
-17-
beispielsweise in Form von Tabletten, Kapseln, Pulvern, Sirups oder in Form von den üblichen sterilen Lösungen für Injektionszwecke angewendet werden. Ergebnisse nach der Anwendung beim Menschen waren sehr aussichtsreich.

Am zweckmäßigsten werden die Verbindungen der Formel I oral in Dosierungseinheiten, wie Tabletten oder Kapseln verabreicht, wobei jede Dosierungseinheit ein nicht toxisches Additionssalz einer der Verbindungen mit einer Säure in einer Menge von etwa 5 bis 100 mg, jedoch am meisten bevorzugt von etwa 10 bis 50 mg enthält, berechnet als freies Amin, wobei die gesamte tägliche Dosis gewöhnlich von etwa 20 bis etwa 200 mg reicht. Die genauen Einzeldosierungen sowie die täglichen Dosierungen in besonderen Fällen werden natürlich nach bewährten medizinischen Grundsätzen unter Anleitung eines Arztes bestimmt.

Bei der Herstellung von Tabletten wird meistens der Wirkstoff mit gewöhnlichen Adjuvantien, wie Maisstärke, Kartoffelstärke, Talkum, Magnesiumstearat, Gelatine, Laktose, Gummen oder dergleichen vermischt.

Wenn die Verbindung der Formel I in Form des freienamins vorliegt, ist vorzugsweise R eine höhere Alkylgruppe mit 8 bis 17 Kohlenstoffatomen einschließlich, wobei die Zubereitung vorzugsweise in Form einer ölligen Lösung für Injektionszwecke vorliegt und solche Lösungen häufig einen sehr verlängerten Effekt aufweisen, verglichen mit der entsprechenden nicht veresterten Verbindung.

Typische Beispiele von Formulierungen für Arzneimittel, die 2-Carbamoyl-4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-c]pyridin-3-on (abgekürzt Lu 18-028) als Wirkstoff enthalten, sind die folgenden:

1. Tabletten mit 10 mg Lu 18-028, berechnet als freie Base in Form des Oxalats:

Lu 18-028:	10 mg
Lactose:	37 mg
Kartoffelstärke:	74 mg
Gelatine:	2 mg
Talkum:	8 mg

2. Kapseln enthaltend je Kapsel:

Lu 18-028:	25 mg
Lactose:	40 mg
Magnesiumstearat:	0,5 mg

Jedes andere pharmazeutische Hilfsmittel zur Tabletierung kann verwendet werden unter der Voraussetzung, daß diese Stoffe mit dem Wirkstoff verträglich sind, und zusätzliche Zubereitungen und Dosierungsformen können ähnlich denjenigen sein, die gegenwärtig für Neuroleptika, wie Thiotixene, Clopenthixol oder Flupenthixol, in Gebrauch sind. Auch Kombinationen der Verbindungen von Formel I sowie ihre nicht-toxischen Säureadditionssalze mit anderen Wirkstoffen, insbesondere anderen Neuroleptika, Thymoleptika, Beruhigungsmittel oder dergleichen fallen in den Erfindungsbereich.

Wie vorher erwähnt ist bei der Isolierung der Verbindungen von Formel I in Form eines Säureadditionssalzes die Säure vorzugsweise derart ausgewählt, daß sie ein Anion enthält, das nicht-toxisch ist und pharmakologisch unbedenklich ist, wenigstens in gewöhnlichen therapeutischen Dosierungen. Representative Salze, die in dieser bevorzugten Gruppe eingeschlossen, sind Hydrochloride, Hydrobromide, Sulfate, Acetate, Phosphate, Nitrate, Methansulfonate, Ethansulfonate, Lactate, Citrate, Tartrate oder Bitartrate, Embonate und Maleate der Amine von Formel I. Andere Säuren sind ebenfalls geeignet und können gegebenenfalls verwendet werden. Beispiele hierfür sind: Fumarsäure, Benzoesäure, Ascorbinsäure, Bernsteinsäure, Salicylsäure, Bismethylensalicylsäure, Propionsäure, Gluconsäure, Apfelsäure, Malonsäure, Mandelsäure, Zimtsäure, Stearinsäure, Palmitinsäure, Itaconsäure, Glycol-Citraconsäure

säure, Benzolsulfonsäure und Sulfaminsäure, die ebenfalls als salzbildende Säuren für die Additionssalze verwendet werden können. Wenn es gewünscht ist, eine erfindungsgemäße Verbindung in Form der freien Basen zu isolieren, kann dies nach üblichen Verfahrensweisen erfolgen, wie durch Lösen des isolierten oder nicht-isolierten Salzes in Wasser, Behandeln mit einem geeigneten alkalischen Material, Extrahieren der freigesetzten freien Base mit einem geeigneten organischen Lösungsmittel, Trocknen des Extrakts und Verdampfen zur Trockne oder fraktioniertes Destillieren, um das freie basische Amin zu isolieren.

Die Erfindung umfaßt auch ein Verfahren zur Linderung, Erleichterung, Milderung oder Hemmung der Manifestationen bestimmter physiologisch-psychologischer Anomalien von Tieren durch Verabreichen einem lebenden Tier, einschließ- lich dem Menschen, einer angemessenen Menge eine Verbin- dung der Formel I oder eines nicht-toxischen Säureadditions- salzes davon. Eine angemessene Menge würde von etwa 0,5 mg bis etwa 20 ^{per kg} mg/Körpergewicht je Tag von etwa 20 mg bis etwa 200 mg je Tag bei der oralen Verabreichung betragen.

Die Erfindung ist nicht auf die genauen Details der Her- stellungsverfahren oder auf die genaue Verbindung oder Zubereitungen gemäß dem Beispielen beschränkt. Offensicht- liche Änderungen und Äquivalente sind dem Fachmann er- sichtlich.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.